

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/066012 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 9/127**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01880

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Februar 2002 (21.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 09 897.9 21. Februar 2001 (21.02.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120  
Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PANZNER, Stef-  
fen [DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE).  
FANKHÄNEL, Stefan [DE/DE]; Herderstrasse 9,  
06114 Halle (DE). ESSLER, Frank [DE/DE]; Au-  
gust-Bebel-Strasse 41, 06108 Halle (DE). PANZNER,  
Cornelia [DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE).

(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Gulde Hengelhaupt  
Ziebig & Schneider, Schützenstrasse 15-17, 10117 Berlin  
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/066012 A2

(54) Title: AMPHOTERIC LIPOSOMES AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: AMPHOTERE LIPOSOMEN UND VERWENDUNG DIESER

(57) Abstract: The invention relates to amphoteric liposomes comprising positive and negative membrane-permanent or membrane-forming charge carriers and to the use of said liposomes.

(57) Zusammenfassung: Es werden amphotere Liposomen vorgeschlagen, die positive und negative membranständige oder membranbildende Ladungsträger umfassen sowie die Verwendung dieser Liposomen.

---

## Amphotere Liposomen und Verwendung dieser

---

5

Die Erfindung betrifft amphotere Liposomen, die zugleich positive und negative membranständige oder membranbildende Ladungsträger umfassen sowie die Verwendung dieser Liposomen.

10

Unter dem Begriff der Lipide werden drei Klassen von Naturstoffen zusammengefasst, die sich aus biologischen Membranen isolieren lassen: Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol mit seinen Derivaten. Dazu gehören aber auch synthetisch erzeugte Stoffe mit ähnlicher Charakteristik. Hier seien die Diacylglycerole, Dialkylglycerole, 3-Amino-1,2-Propandiolester oder -ether oder auch die N,N-Dialkylamine stellvertretend genannt:

20 Von technischem Interesse sind diese Substanzen bei der Herstellung von Liposomen. Diese Liposomen lassen sich unter anderem als Container für Wirkstoffe bei pharmazeutischen Zubereitungen einsetzen. Wünschenswert ist dabei eine effiziente und stabile Verpackung des Cargos, Verträglichkeit mit Körperflüssigkeiten und eine kontrollierbare und gegebenenfalls ortsspezifische Freisetzung des Inhalts.

Beide Anforderungen sind nachteilhafterweise schwer zu vereinen: Je stabiler und dichter die Verpackung ist, desto schwerer gibt sie den eingeschlossenen Wirkstoff wieder frei. Aus diesem Grund wurden Liposomen entwickelt, die ihre Eigenschaften als Reaktion auf einen äußeren Reiz verändern.

Bekannt sind thermosensible und pH-sensitive Liposomen. Die pH-sensitiven Liposomen sind von besonderem Interesse, da dieser Parameter sich auch unter physiologischen Umständen, etwa bei der endozytotischen Aufnahme eines Liposoms in  
5 Zellen oder bei der Passage des Magen-Darm-Trakts, ändern kann. Nach dem Stand der Technik umfassen pH-sensitive Liposomen insbesondere Cholesterolhemisuccinat (CHEMS).

Cholesterolhemisuccinat wird in Mischung mit  
10 Phosphatidylethanolamin zur Herstellung pH-sensitiver Liposomen verwendet (Tachibana et al. (1998); BBRC 251: 538-544, US4891208). Solche Liposomen können von Zellen endozytiert werden und vermögen auf diesem Weg Cargomoleküle in das Innere von Zellen zu transportieren, ohne die  
15 Integrität der zellulären Membran zu verletzen.

Ein wesentlicher Nachteil des CHEMS ist dessen anionischer Charakter. Die damit hergestellten Liposomen besitzen eine negative Gesamtladung und werden nur mit geringer Effizienz  
20 von Zellen aufgenommen. Trotz des oben beschriebenen Transfermechanismus eignen sie sich daher kaum für den Eintransport von Makromolekülen in Zellen.

Für den Eintransport von Wirkstoffen in Zellen (Transfektion)  
25 werden fachgemäß kationische Liposomen verwendet, die über eine möglichst hohe und konstante Oberflächenladung verfügen. Die positive Gesamtladung solcher Partikel führt zu einer elektrostatischen Anheftung an Zellen und in der Folge zu einem effizienten Eintransport. Der Einsatz dieser  
30 Verbindungen und der damit hergestellten Liposomen bleibt aber auf Anwendungen in vitro oder ex vivo beschränkt, da solche positiv geladenen Liposomen mit Serumbestandteilen unkontrollierte Aggregate bilden.

Nachteilig bei den im Stand der Technik verfügbaren pH-sensitiven Liposomen ist die Beschränkung auf sehr wenige pK-Werte, zumeist den der Carboxygruppe im Cholesterolemisuccinat (ca. 4,5). Ein weiterer Nachteil der Verbindungen ist die Beschränkung auf negative Ladungsträger. Diese eignen sich nicht zur effizienten Bindung von Nukleinsäuren und oft auch nicht für Proteine.

Kationische Liposomen zeigen eine gute Bindung von Nukleinsäuren und Proteinen und sind in der Lage, diese Wirkstoffe in Zellen einzubringen. Nachteilhafterweise sind sie nicht für in vivo-Applikationen einsetzbar.

Es bestand daher die Aufgabe, liposomale Strukturen herzustellen, die

- i) einen effizienten Einschluß von Wirkstoffen erlauben,
- ii) diese Wirkstoffe in biologische Zellen transportieren können,
- iii) kompatibel mit dem Einsatz unter in vivo-Bedingungen sind
- iv) einfach und preiswert herzustellen sind.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch amphotere Liposomen gelöst, die mindestens einen positiven und mindestens einen davon verschiedenen negativen Ladungsträger umfassen, wobei der isoelektrische Punkt der Liposomen zwischen 4 und 8 liegt. Die Aufgabe wird also dadurch gelöst, dass Liposomen mit einer pH-abhängig wechselnden Ladung hergestellt werden.

30

Liposomale Strukturen mit den gewünschten Eigenschaften entstehen beispielsweise, wenn bei einem niedrigen pH-Wert die Menge der membranbildenden oder membranständigen

kationischen Ladungsträger die der anionischen überwiegt und sich bei einem höheren pH-Wert diese Verhältnisse jedoch umkehren. Das ist immer dann der Fall, wenn die ionisierbaren Komponenten einen pKa-Wert im Bereich zwischen 4 und 9 haben.

5 Alle kationischen Ladungsträger werden dann bei einem sinkenden pH des Mediums stärker aufgeladen, alle anionischen Ladungsträger verlieren ihre Ladung.

Im Zusammenhang mit der Erfindung sollen folgende Abkürzungen

10 verwendet werden:

CHEMS	Cholesterolhemisuccinat
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
15 PS	Phosphatidylserin
PG	Phosphatidylglycerol
Hist-Chol	Histidinylcholesterolhemisuccinat

Die membranbildenden oder membranständigen Ladungsträger

20 haben die folgende allgemeine Struktur eines Amphiphils:

Ladungsgruppe - Membrananker

Als Membrananker kommen die aus der Natur bekannten Systeme

25 oder deren technische abgewandelten Formen in Frage. Dazu gehören insbesondere die Diacylglycerole, Diacylphosphoglycerole (Phospholipide) und Sterole, aber auch die Dialkylglycerole, die Dialkyl oder Diacyl-1-Amino-2,3-Propandiole, langkettige Alkyle oder Acyle mit 8 bis 25 C-

30 Atomen, Sphingolipide, Ceramide und andere mehr. Diese Membrananker sind fachgemäß und im Stand der Technik bekannt.

Die Ladungsgruppen, die sich mit diesen Ankern kombinieren lassen, können in folgende 6 Gruppen eingeteilt werden:

Stark kationisch,  $pK_a > 9$ , positive Nettoladung: Ihrer  
5 chemischen Natur nach sind das beispielsweise Ammonium-,  
Amidinium-, Guanidinium- oder Pyridiniumgruppen oder  
primäre, sekundäre oder tertiäre Aminofunktionen.

Schwach kationisch,  $pK_a < 9$ , positive Nettoladung: Ihrer  
10 chemischen Natur nach sind das insbesondere Stickstoffbasen  
wie beispielsweise Piperazine, Imidazole und Morpholine,  
Purine oder Pyrimidine. Bevorzugt sind solche  
Molekülfragmente, wie sie in biologischen Systemen vorkommen,  
also beispielsweise 4-Imidazole (Histamin), 2-, 6- oder 9-  
15 Purine (Adenine, Guanine, Adenosine oder Guanosine), 1-, 2-  
oder 4-Pyrimidine (Uracile, Thymine, Cytosine, Uridine,  
Thymidine, Cytidine) oder auch Pyridin-3-carbonsäuren  
(Nicotinsäureester oder -amide).

20 Stickstoffbasen mit bevorzugten  $pK_a$ -Werten entstehen auch  
durch einfache oder mehrfache Substitution des  
Stickstoffatoms mit Niederalkanhydroxylen, etwa  
Hydroxymethyl- oder Hydroxyethylgruppen. Geeignete organische  
Basen aus dieser Gruppe sind beispielsweise Aminopropandiole,  
25 Triethanolamine, Tris-(hydroxymethyl)methylamine, Bis-  
(hydroxymethyl)methylamine, Tris-(hydroxyethyl)methylamine,  
Bis-(hydroxyethyl)methylamine oder die entsprechend  
substituierten Ethylamine.

30 Neutral oder im pH-Bereich zwischen 4 und 9 zwitterionisch:  
Ihrer chemischen Natur nach sind das neutrale Gruppen wie  
Hydroxyle, Amide, Thiole oder Zwitterionen aus einer starken  
kationischen und einer starken anionischen Gruppe wie

beispielsweise das Phosphocholin oder Aminocarbonsäuren, Aminosulfonsäuren, Betaine oder andere Strukturen.

Schwach anionisch,  $pK_a > 4$ , negative Nettoladung: Ihrer  
5 chemischen Natur nach sind das besonders die Carbonsäuren.  
Dazu gehören die aliphatischen, geradkettigen oder  
verzweigten Mono-, Di- oder Tricarbonsäuren mit bis zu 12 C-  
Atomen und 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen.  
Carbonsäuren mit einem geeigneten Verhalten findet man auch  
10 als Substituenten aromatischen Systeme.

Andere anionische Gruppen sind dissoziierbare Hydroxyle oder  
Thiole, wie sie in der Ascorbinsäure, dem N-substituierten  
Alloxan, der N-substituierten Barbitursäure, im Veronal, dem  
15 Phenol oder als Thiolgruppe vorkommen.

Stark kationisch,  $pK_a < 4$ , negative Nettoladung: Ihrer  
chemischen Natur nach sind das funktionelle Gruppen wie  
beispielsweise die Sulfonsäureester oder Phosphorsäureester.

20 Amphotere Ladungsträger,  $pI$  zwischen 4,5 und 8,5, positive  
Nettoladung unterhalb des  $pI$ , negative Nettoladung oberhalb  
des  $pI$ : Ihrer chemischen Natur nach sind diese Ladungsträger  
aus zwei oder mehreren Fragmenten der oben genannten Gruppen  
25 zusammengesetzt. Es ist für die Ausführung der Erfindung  
zunächst nicht wesentlich, ob sich die geladenen Gruppen auf  
ein und demselben Membrananker befinden oder ob sich diese  
Gruppen auf verschiedenen Ankern befinden. Besonders  
bevorzugt für die Ausführung der Erfindung sind amphotere  
30 Ladungsträger mit einem  $pI$  zwischen 5 und 7.

Stark kationische Verbindungen sind beispielsweise:

DC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylethane) carbamoyl]cholesterol

- TC-Chol 3- $\beta$ -[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl]  
cholesterol
- BGSC Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol
- BGTC Bis-guanidinium-tren-cholesterol,
- 5 DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid
- DOSPER (1,3-dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid)
- DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)  
(Lipofectin®)
- DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl  
10 ammoniumbromid)
- DOSC (1,2-dioleoyl-3-succinyl-sn-glycerol cholinester)
- DOGSOSO (1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-succinyl-2hydroxyethyl  
disulfide ornithin),
- DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromid
- 15 DOGS ((C18)<sub>2</sub>GlySper3<sup>+</sup>) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin  
(Transfectam®)
- (C18)<sub>2</sub>Gly<sup>+</sup> N,N-dioctadecylamido-glycin
- CTAB Cetyl-trimethylammoniumbromid
- CPyC Cetyl-pyridiniumchlorid
- 20 DOEPC 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-ethylphosphocholin oder  
andere O-Alkyl-Phosphatidylcholin oder-ethanolamine,  
Amide aus Lysin, Arginin oder Ornithin und  
Phosphatidylethanolamin
- 25 Beispiele für schwach kationische Verbindungen sind:  
His-Chol Histaminyl-Cholesterolhemisuccinat, Mo-Chol  
Morpholin-N-ethylamino-cholesterolhemisuccinat oder  
Histidinyl-PE.
- 30 Beispielhafte für neutrale Verbindungen sind: Cholesterol,  
Ceramide, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine,  
Tetraetherlipide oder Diacylglycerole.



Beispielhafte schwach anionische Verbindungen sind: CHEMS  
 Cholesterolhemisuccinat, Alkylcarbonsäuren mit 8 bis 25 C-  
 Atomen oder Diacylglycerolhemisuccinat. Weitere schwach  
 anionische Verbindungen sind die Amide aus Asparaginsäure,  
 5 oder Glutaminsäure und PE sowie das PS und dessen Amide mit  
 Glycin, Alanin, Glutamin, Asparagin, Serin, Cystein,  
 Threonin, Tyrosin, Glutaminsäure, Asparaginsäure oder anderen  
 Aminosäuren oder Aminodicarbonsäuren. Nach dem gleichen  
 Prinzip sind auch die Ester aus Hydroxycarbonsäuren oder  
 10 Hydroxydicarbonsäuren und PS schwach anionische Verbindungen.

Stark anionische Verbindungen sind beispielsweise: SDS  
 Natriumdodecylsulfat, Cholesterolsulfat, Cholesterolphosphat,  
 Cholesterylphosphocholin, Phosphatidylglycerole,  
 15 Phosphatidsäuren, Phosphatidylinositole,  
 Diacylglycerolphosphate, Diacylglycerolsulfate, Cetylphosphat  
 oder Lysophospholipide.

Amphotere Verbindungen sind z.B.:  
 20 Hist-Chol  $\alpha$ -Histidinyl-Cholesterolhemisuccinat,  
 EDTA-Chol Ethylendiamintetraessigsäure-Cholesterolester,  
 Hist-PS  $\alpha$ -Histidinyl-Phosphatidylserin oder N-Alkylcarnosin.

Die erfindungsgemäßen Liposomen enthalten variable Anteile  
 25 solcher membranbildender oder membranständiger Amphiphile,  
 dass sie einen amphoteren Charakter erhalten. Das heißt, dass  
 die Liposomen ihr Ladungsvorzeichen vollständig wechseln  
 können. Die Menge der bei einem gegebenen pH-Wert des Mediums  
 vorliegenden Ladungsträger eines Liposoms kann nach der  
 30 folgenden Formel berechnet werden:

$$z = \sum n_i * ((q_i - 1) + (10^{(pK - pH)} / (1 + 10^{(pK - pH)})))$$

$q_i$  absolute Ladung der einzelnen ionischen Gruppe unterhalb ihres  $pK$  (Bsp. Carboxyl = 0, einfache Stickstoffbase = 1, Phosphatgruppe der zweiten Dissoziationsstufe = -1 etc.)

$n_i$  Anzahl dieser Gruppen im Liposom.

5

Am isoelektrischen Punkt ist die Nettoladung des Liposomes 0. Durch Mischung anionischer und kationischer Anteile können Strukturen mit weitgehend wählbarem isoelektrischen Punkt erzeugt werden.

10

Die Strukturen können also insbesondere so konstruiert werden, dass mit fallendem pH-Wert eine wirkliche Umladung des Gesamtmoleküls von negativ auf positiv erfolgt. Eine solche Umladung ist insbesondere vorteilhaft, wenn die mit den Strukturen hergestellten Liposomen in physiologischen Zusammenhängen eingesetzt werden sollen. Nur Liposomen mit einer negativen Gesamtladung sind mit Blut- und Serumbestandteilen verträglich. Eine positive Ladung führt zu Aggregationen. Liposomen mit positiver Ladung sind aber sehr gut fusogen und können Wirkstoffe in Zellen transportieren. Eine pH-abhängige Umladung erlaubt daher die Konstruktion von serumkompatiblen, weil negativ geladenen Verbindungen, die sich nach endozytotischer Aufnahme umladen und somit erst in der Zelle fusogen werden.

25

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung weisen die amphoteren Liposomen einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 auf.

30

Die Erfindung betrifft auch amphotere Liposomen, die mindestens einen amphoteren Ladungsträger umfassen, wobei der amphotere Ladungsträger einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 8 aufweist.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante weist der amphotere Ladungsträger der Liposomen einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 auf.

5

Die Erfindung betrifft auch amphotere Liposomen, wobei die Liposomen mindestens einen amphoteren Ladungsträger und einen anionischen und/oder kationischen Ladungsträger umfassen.

10 Zweckmäßig ist es, dass in einer bevorzugten Ausführungsvariante die amphoteren Liposomen einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 aufweisen.

In einer besonderen Ausführungsvariante der Erfindung  
15 umfassen die erfindungsgemäßen Liposomen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Diacylglycerol, Cholesterol, Tetraetherlipid, Ceramid, Sphingolipid und/oder Diacylglycerol. Die Herstellung der Liposomen kann aber selbstverständlich mit vielen Lipidkombinationen entsprechend  
20 der erfindungsgemäßen Lehre ausgeführt werden. So können beispielsweise Liposomen unter Verwendung einer hohen Menge CHEMS (ca. 40%) und einer kleineren Menge DOTAP (ca. 30%) hergestellt werden. Beim pK-Wert der Carboxylgruppe des CHEMS ist die negative Ladung dieser Komponente bereits soweit  
25 zurückgedrängt, dass der positive Ladungsträger in der Summe überwiegt. Eine alternative Formulierung ist die Mischung von CHEMS mit HisChol, wobei hier die stärkere Aufladung des positiven Ladungsträgers HisChol mit der Entladung des negativen CHEMS synergistisch einhergeht.

30

Wird die von sich aus amphotere Verbindung Hist-Chol in eine neutrale Membran, beispielsweise aus einem Phosphatidylcholin, eingebaut, so resultiert ebenfalls ein

amphoteres Liposom mit einem isoelektrischen Punkt, der dem des Hist-Chol weitgehend entspricht.

Dem Fachmann ist bekannt, wie durch vielfältige Variationen  
5 der erfindungsgemäßen Lehre die wichtige Parameter anzupassen sind:

- i) die Ladungsdichte der Liposomen an den Endpunkten der Umladungen durch die Menge und die pKa-Werte der verwendeten Ladungsträger,
- 10 ii) die Steilheit der Umladungskurve durch das Verhältnis der beiden Ladungsträger, durch deren absolute Mengen und durch eine ggf. synergistische Wirkung von zwei komplementären pH-sensitiven Lipiden und
- 15 iii) der Nulldurchgang des Zetapotentials durch das Verhältnis der beiden Ladungsträger wie auch durch die Lage des pK-Wertes oder der pK-Werte.

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung weisen die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000 nm,  
20 bevorzugt zwischen 70 und 250 nm, besonders bevorzugt zwischen 60 und 130 nm auf. Die Herstellung der amphoteren Liposomen erfolgt nach den im Stand der Technik bekannten Methoden, also beispielsweise durch Ethanolinjektion einer Lipidlösung in wäßrige Puffer, durch Hydratisierung von  
25 trockenen Lipidfilmen oder durch Detergenzdialyse. Die Größe der Liposomen kann generell zwischen 50 nm und 10000 nm variieren. Homogene Populationen können durch Hochdruckhomogenisation oder Extrusion hergestellt werden.

30 In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung umfassen die Liposomen einen Wirkstoff.

Zweckmäßig in einer bevorzugten Ausführungsvariante ist der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine RNA, ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung befinden sich mindestens 80% des Wirkstoffes im Innern des Liposoms.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren ~~zur~~  
10 Wirkstoffbeladung der Liposomen, wobei ein definierter pH-Wert zur Verkapselung benutzt wird und ein zweiter pH-Wert zur Abtrennung des nicht gebundenen Materials eingestellt wird.

15 Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur Wirkstoffbeladung der Liposomen, wobei die Liposomen bei einem definierten pH-Wert permeabilisiert und verschlossen werden.

20 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Liposomen zur Herstellung von Nanokapseln durch Abscheidung von Polymeren oder Polyelektrolyten auf der Lipidschicht. Dabei kann eine einfache oder mehrfache Abscheidung solcher Substanzen auf der Oberfläche erfolgen. Bei einer mehrfachen Abscheidung,  
25 die gegebenenfalls unter Anwesenheit von Vernetzer durchgeführt wird, entstehen liposomale Nanoakapseln, wie sie in der WO 00/28972 oder in der WO01/64330 beschrieben sind. Vorteilhaft bei der Verwendung der hier beschriebenen Substanzen ist die Tatsache, dass die elektrostatische  
30 Interaktion mit dem Polyelektrolyten unterbrochen werden kann. Es ist bekannt, dass die Wechselwirkung eines Polyelektrolyten mit Ladungsträgern der liposomalen Membran zur Entmischung von Membranbestandteilen und zur Bildung von

Lipidclustern führen kann. In vielen Fällen geht diese Entmischung mit einer Permeabilisierung des Liposoms einher. Die erfindungsgemäßen Substanzen ermöglichen eine Abschaltung dieser Wechselwirkung nach dem Beschichtungsprozess. Wird der  
5 pH-Wert zu diesem Zeitpunkt erhöht, so sind die Liposomen nur noch sterisch in der Nanokapseln eingeschlossen, eine Wechselwirkung der Membran mit den Polyelektrolyten besteht dann nicht mehr. Clusterbildung der Lipide und damit verbundene Permeabilisierung der Membran können so umgangen  
10 werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen zur Verpackung und Freisetzung von Wirkstoffen. In dieser Ausführungsvariante dienen die  
15 Liposomen insbesondere der effizienten Verpackung von Wirkstoffen; beispielsweise Nukleinsäuren. Nukleinsäuren werden mit den genannten Lipiden insbesondere bei einem niedrigen pH-Wert (ca. 3 bis 6) inkubiert. Nach Bildung der Liposomen können außen anhaftende Nukleinsäuren durch den  
20 Wechsel zu einem hohen pH-Wert (ca. 7...9) abgewaschen werden.

Ein analoges Vorgehen kann für die Verpackung von Proteinen gewählt werden. Hier wird mit Vorteil ein pH im Medium eingestellt, der zwischen dem pI des Liposoms und dem des  
25 Proteins liegt. Als besonders vorteilhaft erweist es sich, wenn die beiden pI-Werte mehr als eine Einheit auseinander liegen.

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung werden  
30 die Liposomen zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung werden die Liposomen als Transfektionssystem verwendet, das heißt zum Einbringen von Wirkstoffen in Zellen.

5

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung werden die Liposomen zur gesteuerten Freisetzung ihres Inhalts durch Fusion oder Permeabilisierung der Membran verwendet. So können Liposomen aus einem allein nicht membranbildenden  
10 Lipid, etwa PE durch den Einbau von Ladungsträgern stabilisiert werden. Wird der Ladungsträger in einen neutralen ungeladenen oder zwitterionischen Zustand überführt, so erhöht sich die Permeabilität der Membran. Bekannte Liposomen nach dem Stand der Technik erlauben (PE/  
15 CHEMS, Tachibana et al.) eine solche Permeabilisierung bei niedrigen pH-Werten, wie sie unter physiologischen Bedingungen nur im Inneren von Endosomen oder bei einer Magenpassage erreicht werden. Amphotere Liposomen können nach den oben ausgeführten Maßnahmen so hergestellt werden, dass  
20 ihr Neutralpunkt bei jedem gewünschten pH-Wert zwischen 4 und 9 liegt. Unter diesen Bedingungen sind die Liposomen permeabel und können ein Cargo ins Medium abgeben.

Die liposomalen Formulierungen können jedoch unter  
25 Bedingungen geringer Permeabilität hergestellt, prozessiert und gelagert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Liposomen so hergestellt, dass sie unter Bedingungen eines physiologischen pH-Wertes ihre Cargo freisetzen, bei einem niedrigen pH-Wert jedoch ihr Cargo  
30 sicher einschließen. Solche Liposomen eignen sich besonders zur Herstellung von Formulierungen mit einer langsamen Freisetzungskinetik, wobei die Freisetzung erst durch den

Kontakt mit Körperflüssigkeiten initiiert wird, nicht jedoch schon bei der Lagerung oder beim Transport.

Eine bevorzugte Ausführung der erfindungsgemäßen Lehre besteht daher im dem Einsatz solcher Liposomen zu therapeutischen Zwecken, insbesondere für solche Anwendungen, die ein spezifisches Targeting der Liposomen benutzen. Die geringe unspezifische Bindung ist hier Voraussetzung für einen Transport der Liposomen bis zum Zielort. Eine hohe unspezifische Bindung würde im Gegensatz dazu den Transport der Liposomen zu ihrem Zielort verhindern. Eine spezifische Bindung kann durch weitere Maßnahmen nach dem Stand der Technik erreicht werden, also durch eine Größenselektion der Liposomen oder auch die Bindung von Liganden an die liposomale Oberfläche, der an einen Zielrezeptor der Zelloberfläche bindet. Liganden können beispielsweise Antikörper oder deren Fragmente, Zuckerstoffe, Hormone, Vitamine, Peptide wie zB. das Arg-Gly-Asp (RGD), Wachstumsfaktoren, Bilirubin, oder anderen Komponenten sein.

Eine bevorzugte Ausführungsvariante der erfindungsgemäßen Lehre betrifft die Verwendung der Liposomen für therapeutische oder diagnostische Anwendungen unter in vivo-Bedingungen. Bevorzugt sind solche Liposomen, die eine geringe unspezifische Bindung und damit Fusionsneigung unter physiologischen Bedingungen zeigen, aber eine starke Bindung und hohe Fusionskompetenz unter veränderten Bedingungen aufweisen. Solche Liposomen sind amphotere Liposomen, die unter physiologischen Bedingungen eine anionische Gesamtladung des Partikels besitzen, bei einem  $\text{pH} < 6,5$  jedoch eine zunehmende kationische Aufladung zeigen. Solche pH-Werte kommen bei der Endozytose der Liposomen in Zellen vor. Solche pH-Werte kommen auch im Innern von Tumoren vor. Diese pH-



Werte findet man auch in den äußeren Schichten der Haut. Niedrige pH-Werte können auch ex vivo bei der Perfundierung eines Organs für einen gewissen Zeitraum eingestellt werden. Eine hohe Bindungsstärke und Fusionskompetenz ist daher auf  
5 solche Liposomen beschränkt, die bereits von Zellen oder speziellen Geweben aufgenommen wurden. Bindungsstärke und zunehmende Fusionskompetenz unterstützen die Verschmelzung der liposomalen Membran mit der Zellmembran. Dieses Ereignis führt zu einer direkten Freisetzung des Cargos in das  
10 Zellinnere, ohne lytische Komponenten des Endosoms freizusetzen und damit das Cargo oder Zellbestandteile zu gefährden.

Zweckmäßig ist weiterhin die Verwendung der Liposomen als  
15 Depotformulierung und/oder als zirkulierendes Depot. Mit Vorteil können die Liposomen auch bei intravenöser oder peritonealer Applikation verwendet werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung werden die Liposomen als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in  
20 vitro und ex vivo eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Liposomen weisen mehrere Vorteile auf. Kationisch aufladbare Liposomen aus 40% HisChol und PC binden auch unter Bedingungen eines neutralen pH-Wertes Nukleinsäuren, wie z.B. DNA an ihrer Membran. 5 Überraschenderweise wird diese Bindung vollständig unterdrückt, wenn die oben angegebenen Liposomen unter zusätzlicher Verwendung von 5% PG hergestellt werden und dann amphotere Eigenschaften haben. Die Bindung von Nukleinsäuren an die Membran ist jedoch durch Verringerung des pH-Wertes 10 wieder herstellbar. Liposomen nach der erfindungsgemäßen Lehre sind daher sehr gut zur pH-abhängigen Bindung von Nukleinsäuren geeignet.

Es wurde weiterhin überraschend gefunden, dass auch eine 15 Reihe von Proteinen sich in der für die Nukleinsäuren beschriebenen Art verhalten. So binden Antikörper nicht bei neutralen pH-Wert, wohl aber unter leicht sauren Bedingungen effektiv an die Membran der erfindungsgemäßen Liposomen. Ein solches Verhalten kann weder bei pH-sensitiven Liposomen aus 20 einem Neutrallipid und CHEMS noch bei solchen aus einem Neutrallipid und HisChol beobachtet werden. Es ist daher eine besondere Eigenschaft der amphoteren Liposomen. Es überraschenderweise auch gefunden, dass Liposomen gemäß der vorliegenden Erfindung im Gegensatz zu den bekannten 25 konstitutiv kationischen Liposomen serumkompatibel sind. Eine zweckmäßige Ausführung der erfindungsgemäßen Lehre besteht daher beim Einsatz solcher Liposomen zu therapeutischen Zwecken. Ein Vorteil der Liposomen ist, dass sie eine wesentlich geringere unspezifische Bindung an Zellen 30 aufweisen, als dies bei bekannten konstitutiv kationischen Liposomen der Fall ist.

Überraschend ist auch, dass die Fusionskompetenz der erfindungsgemäßen Liposomen vom pH-Wert des Mediums abhängig ist. Die Fusionskompetenz gegenüber biologischen Membranen von Zellen wird durch die Wahl des Lipids, aber auch durch  
5 die Aufladung der Liposomen bestimmt. Der eigentlichen Fusion geht für gewöhnlich ein Bindungsschritt voraus. Eine starke Bindung der Liposomen an Zellmembranen aber nicht immer wünschenswert, sondern soll wie oben beschrieben nur unter kontrollierten Bedingungen in bestimmten Zellen oder Geweben  
10 erfolgen.

Die Liposomen können daher zur Konstruktion von liposomalen Vektoren für den Transport von Wirkstoffen in Zellen genutzt werden. Als Wirkstoffe kommen alle Stoffe in Frage, die nicht  
15 mizellbildend sind. Besonders geeignete Wirkstoffe sind wasserlösliche Stoffe. Das sind viele Proteine und Peptide, insbesondere Antikörper oder Enzyme oder Antigene, alle Nukleinsäuren, unabhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Abstammung von RNA oder DNA. Das sind aber auch andere  
20 biologische Makromoleküle wie etwa komplexe Zucker, Naturstoffe und weitere Verbindungen. Das sind ebenfalls niedermolekulare Wirkstoffe synthetischen oder natürlichen Ursprungs, die sonst nicht die Zellmembran als Barriere durchdringen können. Solche Stoffe können dann mit Hilfe der  
25 Vektoren in das Innere von Zellen transportiert werden und Wirkungen auslösen, die ohne diesen Transport nicht möglich wären.

Mit Hilfe der erfinderischen Lehre können somit Liposomen  
30 hergestellt werden, deren Fusions- und Bindungseigenschaften sich bei verschiedenen pH-Werten unterscheiden. Es können daher auf diesem Wege serumkompatible Liposomen hergestellt werden, die mit einer großen Menge von Wirkstoffen beladen

sind und diese in das Innere von Zellen transportieren. Es ist dem Fachmann möglich, Elemente der erfindungsgemäßen Lehre miteinander zu kombinieren und damit Liposomen herzustellen, die optimal für einen bestimmten Zweck geeignet  
5 sind.

Die Erfindung soll im folgenden anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele zu beschränken ist.

**Beispiel 1**

**Herstellung und Ladungseigenschaften amphoterer Liposomen mit  
5 positiv aufladbarem und konstant negativ geladenem  
Ladungsträger**

5 mg His-Chol und 7.8 mg POPC und 2 mg DPPG werden in 4 mL  
Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gelöst und im  
10 Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Der Lipidfilm  
wird mit 4.3 mL des entsprechenden Puffers (10 mM KAc, 10 mM  
HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 in einer Lipidkonzentration von 5  
mM durch 5 min Ultraschallbehandlung hydratisiert.  
Abschließend wird die Suspension eingefroren und nach dem  
15 Auftauen mehrfach extrudiert (Avestin LiposoFast,  
Polycarbonatfilter 200nm Porenweite). Zur Messung des  
Zetapotentials wird eine Endkonzentration der Liposomen von  
0,2 mM eingestellt. Zur Verdünnung wird das oben genannte  
Puffersystem bei einem pH von 7,5 bzw. 4,2 benutzt. Die  
20 gemessenen Zetapotentiale liegen bei -18mV (pH7.5) bzw. bei  
+35mV (pH4.2).

**Beispiel 2**

25

**Herstellung und Ladungseigenschaften amphoterer Liposomen mit  
konstant positivem und veränderlich negativem Ladungsträger**  
POPC, DOTAP und CHEMS werden in den unten angegebenen molaren  
Verhältnissen in 4 mL Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gelöst  
30 und im Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Der  
Lipidfilm wird mit 4.3 mL des entsprechenden Puffers (10 mM  
KAc, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) in einer  
Gesamtlipidkonzentration von 5 mM durch 5 min

Ultraschallbehandlung hydratisiert. Abschließend wird die Suspension eingefroren und nach dem Auftauen mehrfach extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonatfilter 200nm Porenweite). Die untenstehende Tabelle zeigt die  
 5 Zetapotenziale in Abhängigkeit vom pH.

Zusammensetzung der Liposomen in mol-%

	Liposom 1	POPC 50	DOTAP 40	Chems 10
	Liposom 2	POPC 50	DOTAP 30	Chems 20
10	Liposom 3	POPC 50	DOTAP 25	Chems 25
	Liposom 4	POPC 50	DOTAP 20	Chems 30
	Liposom 5	POPC 50	DOTAP 40	Chems 10

Tabelle 1. Zetapotenziale in mV

pH-Wert	Liposom1	Liposom2	Liposom3	Liposom4	Liposom5
4	44,2	38,4	34,7	31,7	16,2
5	39,9	25,6	27,2	22,1	3,3
6	37	21,4	16,4	2,5	-7,3
7,5	29,2	1,8	-7,9	-18,9	-34,6

15 Durch geeignete Zusammensetzung ist die Höhe des Zetapotenzials und dessen Steilheit in weiten Grenzen wählbar.

20 **Beispiel 3**

**Herstellung und Ladungseigenschaften amphoterer Liposomen mit kompletter Schaltbarkeit in einer Verbindung**

25 5 mg Hist-Chol und 9.8 mg POPC werden in 4 mL Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gelöst und im Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit 4.3 mL des entsprechenden Puffers (10 mM Kac, 10 mM

HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 in einer Lipidkonzentration von 5 mM durch 5 min Ultraschallbehandlung hydratisiert. Abschließend wird die Suspension eingefroren und nach dem Auftauen mehrfach extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonatfilter 200nm Porenweite). Der Verlauf des Zetapotentials bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken ist in der untenstehenden Tabelle dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2

pH-Wert	ohne Salz	100 mM NaCl
4	45,6	20,2
5	26,9	2,2
6	-4,1	-5,2
7	-31,4	-15,3
8	-45,7	-25,4

10

#### Beispiel 4

##### 15 Serumaggregation

Lipidfilme werden wie in Beispiel 1 hergestellt. Als Vergleichprobe dient eine Lipidmischung, die kein DPPG enthält. Die Lipidfilme werden in Puffer (10mM Phosphat, 150mM NaCl, pH7.4) hydratisiert und wie oben extrudiert. Humanes Serum wird mit einer gleichen Menge Puffer (10mM Phosphat, 150mM NaCl, pH 7.4) verdünnt, partikuläre Bestandteile und Fett werden durch Zentrifugation (20min, 13.000rpm, 4°C) entfernt, das klare Serum wird mit einem Filter der Porenweite 0.2µm steril filtriert.

25

Die oben präparierten Liposomen werden in einer Konzentration von 1mM zum Serum gegeben und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation ist die Suspension der DPPG-haltigen Liposomen gleichmäßig trüb, ohne dass eine Flockung beobachtet

werden kann. Der Durchmesser der Liposomen wird mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt und ist um weniger als 10% gegenüber der Ausgangsprobe verändert. Die Suspension der DPPG-freien Liposomen zeigt deutliche Flockung.

5

### Beispiel 5

#### 10 Serumstabilität der Membran

Neben der Serumaggregation wurde auch das Austreten eines Wirkstoffes (Carboxyfluorescein, CF) in Gegenwart von Humanserum untersucht. Dazu wurden POPC/DOTAP/CHEMS Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung nach Beispiel 2  
15 hergestellt:  
POPC 100% (als Kontrolle), POPC/DOTAP/CHEMS 60:30:10, 60:20:20 und 60:10:30 (Angaben in Mol%). Nicht eingeschlossenes CF wurde durch Gelfiltration abgetrennt. Zur Messung wurden die Liposomen auf 0.1 mM in Serum verdünnt und  
20 bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde eine Probe von 30 µl entnommen und mit 100 mM TRIS Puffer, pH 8.2 auf 300 µl verdünnt und die Fluoreszenz gemessen. Die 100% Werte wurden durch Auflösen der Liposomen mit 10 µl Triton X-100 (10% in Wasser) gewonnen. Der Zeitverlauf des  
25 eingeschlossenen CF ist in der untenstehenden Tabelle dargestellt.

Die Liposomen verlieren nur wenig CF in Serum über den gemessenen Zeitraum von 4 h. POPC/DOTAP/CHEMS 60:30:10 und  
30 60:20:20 besitzen nach 4 h noch circa 75%, POPC und POPC/DOTAP/CHEMS 60:10:30 sogar an die 100% ihres ursprünglichen CF-Gehalts (siehe Tabelle 3).



Tabelle 3.

Zeit in min	POPC	POPC/DOTAP/CHEMS 60:30:10	POPC/DOTAP/CHEMS 60:20:20	POPC/DOTAP/CHEMS 60:10:30
0	100%	100%	100%	100%
15	91%	84%	95%	107%
60	94%	81%	87%	110%
120	96%	80%	76%	105%
240	96%	80%	77%	107%

## 5 Beispiel 6

## Bindung von DNA

Liposomen mit folgenden Zusammensetzungen werden wie in Beispiel 1 hergestellt: (alle Angaben in Mol%)

- A: 60 POPC 40 HisChol  
 10 B: 55 POPC 40 HisChol 5 CHEMS  
 C: 60 POPC 20 HisChol 20 CHEMS

Die Liposomen werden in einer Konzentration von 0.2mM in Puffer (10 mM Kaliumacetat, 10 mM HEPES, pH 4.2 bzw. 7.5) suspendiert. 45 µl einer DNA-Lösung (1mg DNA (Hering sperm, SIGMA D3159) in 1 ml Wasser) werden zu jeweils 1 ml der unterschiedlichen Liposomenproben gegeben und schnell gemischt. Nach 15min Inkubation wird die Probe mit 6 ml des entsprechenden Puffers aufgefüllt und das Zetapotential der Liposomen vermessen (Tabelle 4).

Tabelle 4.

Lipid	pH 4.2		pH 7.5	
	-DNA	+DNA	-DNA	+DNA
A	+ 47.6	- 32.0	+ 2.4	- 44.4
B	+ 47.8	- 28.1	+ 0.1	- 38.4
C	+ 34.0	- 28.6	- 10.1	- 24.7

Unter den Bedingungen eines Überschusses kationischer Ladungen (pH 4.2) findet eine starke Umladung der Partikel statt. Beim neutralen pH von 7.5 kann das CHEMS in hoher Konzentration (Liposom C) die Ladung des HisChol überkompensieren, die Partikel haben ein negatives Zetapotential. An solche Partikel binden nur noch geringe Mengen DNA.

## 10 Beispiel 7

### Bindung und Ablösung von DNA

Liposomen der Zusammensetzungen POPC/DOTAP/CHEMS 60:15:25 und POPC/DCChol/CHEMS 60:15:25 (alle Angaben in Mol%) wurden nach  
15 Beispiel 2 hergestellt. Die Bindung von DNA wurde nach obigem Beispiel bei pH 4,2 durchgeführt und die Zetapotentiale bestimmt. Anschließend wurden die Proben auf einen pH von 7,5 eingestellt und wiederum das Zetapotential gemessen.

Mischung	Zeta [mV]
20 a) POPC/DCChol/CHEMS 60:15:25 (pH 4,2) (Aggregate)	-43,5
b) POPC/DOTAP/CHEMS 60:15:25 (pH 4,2)	-43,7
c) POPC/DCChol/CHEMS 60:15:25 (pH 7,5)	-18,5
d) POPC/DOTAP/CHEMS 60:15:25 (pH 7,5)	-14,5

25

In Gegenwart von DNA wird bei niedrigem pH ein negatives Zetapotential gemessen, die ursprünglichen Partikel waren jedoch positiv geladen. Nach dem Wechsel zum neutral-pH verringert sich diese durch DNA bedingte Aufladung. Die  
30 Zetapotentiale nähern sich dem der unbehandelten Liposomen (-11mV bei pH 7,5)

**Beispiel 8****DNA-Einschluß und Ablösung nicht verkapselten Materials**

5 Zwei Liposomenformulierungen der Zusammensetzung  
POPC60/DOTAP15/CHEMS25 bzw. POPC85/DOTAP15 werden als  
trockene Lipidfilme wie oben beschrieben hergestellt. Die  
Gesamtmenge des Lipids betrug jeweils 4  $\mu$ Mol. Zur  
Hydratisierung wurde Herings-DNA in 10mM Kac, 10mM HEPES und  
10 100mM NaCl pH4,0 gelöst. 4mg der DNA wurde direkt zu den  
Lipidfilmen gegeben. Die entstandenen Liposomen wurden  
mehrfach eingefroren und getaut und anschließend durch ein  
200nm -Filter extrudiert.

Je 500  $\mu$ l der Partikel wurden mit 2,5 ml einer Sucroslösung  
15 gemischt (0,8M Sucrose in Puffer wie oben, pH-Wert 4,0 oder  
7,5) und mit 1,5ml einer 0,5M-Sucroslösung sowie 0,5ml des  
Puffers überschichtet.

Liposomen wurden dann von nicht gebundener DNA durch  
Flotation getrennt. Die Liposomen wurden nach der Flotation  
20 von der Grenzfläche Puffer / 0,5M Sucrose abgenommen.

Die Bestimmung der gebundenen DNA-Menge erfolgt durch  
Interkalation von Propidiumiodid, für die Bestimmung der  
Lipidmenge wurde der Stewart-Assay verwendet. Im Stewart-  
Assay spricht nur das verwendete PC an, die anderen Lipide  
25 wurden anhand dieses Wertes berechnet. Die Ergebnisse sind in  
der untenstehenden Tabelle dargestellt (Tabelle 5).

**Tabelle 5.**

Liposom	pH 4,0	pH 7,5
POPC/DOTAP/CHEMS 60/15/25	2 $\mu$ g DNA/ $\mu$ g DOTAP	1,2 $\mu$ g DNA/ $\mu$ g DOTAP
POPC/DOTAP 85/15	2,3 $\mu$ g DNA/ $\mu$ g DOTAP	2,3 $\mu$ g DNA/ $\mu$ g DOTAP

Mit den amphoteren Liposomen flotiert nach dem pH-Wechsel auf 7,5 nur noch etwa die Hälfte der gebundenen DNA nach oben. Dieses Material ist das wirklich eingeschlossene Material. Analoge Ergebnisse wurden bei einem Verdau mit DNase erhalten.

Von konstitutiv kationischen Liposomen lässt sich DNA durch pH-Wechsel und auch durch eine zusätzliche Erhöhung der Ionenstärke nicht wieder ablösen und verbleibt immer an der Aussenseite.

10

### Beispiel 9

#### Fusionseigenschaften

Liposomen mit folgenden Zusammensetzungen werden wie in Beispiel 1 hergestellt (alle Angaben in Mol-%):

- A) POPC 60 HisChol 40  
 B) POPC 55 HisChol 40 CHEMS 5  
 X) POPC 100  
 Y) POPC 60 DPPG 40

Die fakulativ kationischen Liposomen A oder B werden mit den neutralen Liposomen X oder den anionischen Liposomen Y im Puffer (10mM HEPES, 10mM Kaliumacetat, pH4.2 bzw. 7.5) inkubiert. Die eventuelle Fusion von Liposomen wird mittels Größenmessung durch dynamische Lichtstreuung analysiert (Tabelle 6).

#### Tabelle 6.

Liposom 1	X	X	Y	Y
Liposom 2	A	B	A	B
pH 4.2	181,6 nm	191,9 nm	1689,3 nm	2373,2 nm

pH 7.5	191,8 nm	202,4 nm	250,0 nm	206,3 nm
--------	----------	----------	----------	----------

Die Ausgangsgrößen der Liposomen betrugen bei pH 4.2 161,8 nm und 165,9 nm bei pH 7.5

A) 183,2nm

5 X) 199,2nm

Y) 183,2nm

Die Größe der komplementär geladenen Paare (YA und YB) unterscheidet sich deutlich von der Größe der  
10 Mischsuspensionen mit dem Neutralliposom X. Das Ausmaß der Wechselwirkung ist durch das Maß der Aufladung der fakultativ kationischen Liposomen bestimmt. Eine Fusion zu größeren Einheiten ist nicht von dem fusogenen Lipid PE abhängig.

15

#### Beispiel 10

##### Permeabilität gegenüber Makromolekülen

13.75µmol DOPE, 2.5µmol CHEMS und 10µmol HisChol werden in  
20 Isopropanol gelöst und das Lösungsmittel wird unter Vakuum abgezogen. Zu dem getrockneten Lipidfilm gibt man 2.5ml einer Lösung von Proteinase K in Puffer (1mg/ml Proteinase K, 10mM Kaliumacetat, 10mM HEPES, 150mM NaCl, pH4.2). Nach der Hydratisierung des Films werden die gebildeten Liposomen  
25 durch eine 400nm-Membran extrudiert. Nicht eingeschlossene Proteinase wird durch Flotation der Liposomen im Sucrosegradienten abgetrennt. Die so hergestellten Liposomen werden mit 7.5ml Puffer bei pH4.2 und pH7.2 inkubiert (Puffer wie oben, Ausgangs-pH 4.2 und 8.0). Nach der Inkubation wird  
30 freigesetzte Proteinase K durch Ultrafiltration mit einer 0.1 µm-Membran abgetrennt. Die im Filter verbleibenden Liposomen

werden dann mit 7.5ml einer Lösung von Triton X-100 in Puffer (wie oben, pH 8.0) behandelt.

Alle Filtrate werden auf die Anwesenheit von Proteinase K  
5 getestet. Dazu wird eine Lösung von Azocasein (6 mg/ml Azocasein in 1 M Harnstoff, 200 mM Tris-Sulfat pH 8.5) verwendet. 500µl dieser Lösung werden mit 100µl Filtrat oder Puffer gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10% Trichloressigsäure  
10 gestoppt. Präzipitierte Proteine werden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Färbung im Überstand wird bei 390nm gemessen (Tabelle 7).

Tabelle 7.

pH Inkubation	Triton X100	Absorption bei 390nm - Blank
4.2	-	0,0192
4.2	+	0,2345
7.2	-	0,2210
7.2	+	0,0307

15 Erfolgt die Inkubation der Liposomen bei einem pH-Wert von 4.2, so wird keine oder nur sehr wenig Proteinase K freigesetzt. Erst die Auflösung der Liposomen mit Triton X100 führt zur Freisetzung des Enzyms. Wenn die Liposomen bei  
20 einem pH-Wert von 7.2 inkubiert werden, so wird bereits ohne Zugabe von Triton der Großteil des Enzyms freigesetzt und findet sich im ersten Filtrat. Die Zugabe von Triton kann dann kaum noch weiteres Enzym aus den Liposomen herauslösen.

**Beispiel 11****Proteinbindung**

Liposomen der Zusammensetzung POPC50/ DOTAP10/ CHEMS40 (alle  
5 Angaben in mol-% werden wie in den vorhergehenden Beispielen  
hergestellt. Zur Hydratisierung der Lipidfilme wird eine  
Lösung von 0,26 mg/ml Lysozym in Puffer (10 mM MES pH 5,0  
oder pH 6,0 bzw. 10 mM HEPES pH 7,0 oder pH8,0)  
verwendet. Alle Proben werden nach der Hydratisierung mehrfach  
10 eingefroren und getaut. Anschließend werden die Liposomen  
mittels Ultraschall homogenisiert und durch ein 200nm-Filter  
extrudiert.

Die so hergestellte Liposomensuspension werden durch Zugabe  
15 von Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt.  
Anschließend werden die Liposomen von nicht eingebautem  
Protein durch Flotation getrennt. In der untenstehenden  
Tabelle ist der Anteil des eingeschlossenen Proteins  
wiedergegeben (Tabelle 8).

20

**Tabelle 8.**

pH-Wert beim Einschluss	% eingeschlossenes Material
5,0	4
6,0	21
7,0	75
8,0	80

Liposomen der verwendeten Zusammensetzung zeigen einen pI von  
5, das Lysozym ist ein basisches Protein mit einem pI von  
25 11,35 . Im pH-Bereich zwischen 6 und 8 sind daher beide  
Partner entgegengesetzt geladen. Durch die elektrostatische  
Anziehung wird ein effizienter Einschluss in die Liposomen  
bewirkt. Nicht verkapseltes Protein wurde einem pH von 4

entfernt. Bei diesem pH wird die Wechselwirkung zwischen den Partnern aufgehoben.

## 5 Beispiel 12

### Transfektion in Zellen

HeLa-Zellen oder CHO-Zellen ( $3 \cdot 10^5$ ) wurden in jede Kavität einer 6-well Titerplatte ausplattiert und für drei Tage kultiviert. Liposomen (POPC/DOTAP/CHEMS 60/30/10) wurden in  
10 Gegenwart von fluoreszenzmarkiertem Dextran (TRITC-Dextran, 10mg/ml im Hydratisierungspuffer) hergestellt. Nicht eingebautes TRITC-Dextran wurde durch Gelfiltration entfernt. Die so hergestellten Liposomen wurden zu den Zellen gegeben und für 6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen  
15 zweimal mit Puffer gewaschen. Die Aufnahme des Dextrans wurde im mikroskopischen Bild verfolgt. Die Ergebnisse sind in der Figur 1 dargestellt.

## 20 Beispiel 13

### Ligandenbindung und Transfektion

Liposomen der Zusammensetzung POPC/DOTAP/Chems/N-glutaryl-DPPE (50:10:30:10 (mol%)) werden nach Beispiel 2 hergestellt,  
25 dabei werden sie mit einer Lösung von 3mg/ml TRITC-Dextran (Mw ca. 4400) in Hepes 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,5 hydratisiert. Nichteingeschlossenes TRITC-Dextran wird durch Gelfiltration über eine Sephadex G-75 Säule abgetrennt. Die Bindung des cyclischen Peptides RCDCRGDCFC an die liposomale  
30 Oberfläche wurde durch Aktivierung des N-glutaryl-DPPEs mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimid) erreicht (3.5 mg EDC zu 400µl Liposomensuspension) und anschließendes



Rühren im Dunkeln über 5 h. Dann wurde das RGD-Peptid (250 µg in 150 µl Puffer) zugegeben und über Nacht gerührt. Die Liposomen wurden durch Gelfiltration vom nichtgebundenen Peptid abgetrennt.

- 5 Humane Endothelzellen (HUVEC) wurden in Spezialmedium kultiviert. Die mit Ligand modifizierten Liposomen und Kontrollliposomen ohne RGD-Ligand werden als 0.5 mM Suspension auf die Zellen gegeben. Nach 2 Stunden werden die Liposomen abgenommen und die Zellkammern 3 mal mit PBS-Puffer
- 10 gespült und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zellen, die mit RGD-Liposomen behandelt wurden zeigten eine erheblich höhere rote TRITC- Fluoreszenz als die Kontrollliposomen.

15

#### Beispiel 14

Pharmakokinetik (Blutspiegel und Organverteilung) von pH-schaltbaren Liposomen

20

Je 500 µL Liposomen aus POPC/Chol (60:40), POPC/Hist-Chol/Chol (60:20:20) und POPC/DOTAP/Chems (60:10:30) wurden männlichen Wistar-Ratten per Injektion in die Schwanzvene verabreicht.

25

- 50 mM Liposomen-Suspensionen wurden hergestellt durch Hydratisieren eines Lipidfilms der entsprechenden Formulierung (Addition von 0,03 mol% [14]C-DPPC) mit 2 mL einer Lösung von 1 mg [3]H-Inulin in HEPES 10 mM, NaCl 150
- 30 mM, pH 7.5). Nach 3 Einfrier/Auftau-zyklen wurden die Suspensionen durch eine 400 nm-Membran mehrfach extrudiert (LiposoFast, Avestin). Abtrennung von nichteingeschlossenem [3]H-Inulin erfolgte durch Gelfiltration über eine G-75

Sephadex-Säule und anschließende Konzentrierung über CENTRIPREP (Millipore) Zentrifugationseinheiten.

4 Versuchstieren je Formulierung wurden 0.5 mL Liposomensuspension verabreicht und Blutproben nach 5 min, 15 min, 60 min, 3 h, 12 h, 24 h genommen. Die Radioaktivität der Membranfraktion und des löslichen Cargos wurden per Szintillation vermessen und ergaben folgende Werte:

Eliminationshalbwertszeiten aus dem Blut:

10	POPC/Chol	größer 120 min
	POPC/DOTAP/Chems	größer 120 min
	POPC/Hist-Chol	größer 120 min

Mit ihrer relativ langen Halbwertszeit im Blut erfüllen die erfindungsgemäßen Liposomen die Grundvoraussetzungen für ein Vektorsystem. Sie sind nicht akut toxisch und werden nicht sofort vom retikuloendothelialen System aufgenommen. Das Verhältnis der  $^3\text{H}$  und der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität der Blutproben war bis zum Ende des Experiments konstant. Es findet daher in keinem Fall eine Freisetzung des Cargos durch Complementlyse statt.

**Patentansprüche**

- 5      1. Amphotere Liposomen, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen mindestens einen positiven und mindestens einen davon verschiedenen negativen Ladungsträger umfassen, wobei die Liposomen einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 8 aufweisen.
- 10      2. Amphotere Liposomen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 aufweisen.
- 15      3. Amphotere Liposomen, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen mindestens einen amphoteren Ladungsträger umfassen, wobei der amphotere Ladungsträger einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 8 aufweist.
- 20      4. Amphotere Liposomen dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der amphotere Ladungsträger einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 aufweist.
- 25      5. Amphotere Liposomen, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen mindestens einen amphoteren Ladungsträger und einen anionischen und/oder kationischen Ladungsträger umfassen.
- 30      6. Amphotere Liposomen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 7 aufweisen.

7. Amphotere Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen ein neutrales Lipid umfassen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Cholesterol, Tetraetherlipid, Ceramid, Sphingolipid und/oder Diacylglycerol.
8. Amphotere Liposomen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000 nm, bevorzugt zwischen 70 und 250 nm, besonders bevorzugt zwischen 60 und 130 nm aufweisen.
9. Amphotere Liposomen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen einen Wirkstoff umfassen.
10. Amphotere Liposomen nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine RNA, ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid ist.
11. Amphotere Liposomen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich mindestens 80% des Wirkstoffes im Innern des Liposoms befinden.
12. Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen gemäß der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass ein definierter pH-Wert zur Verkapselung benutzt wird und ein zweiter pH-Wert zur Abtrennung des nicht gebundenen Materials eingestellt wird.

13. Verfahren zur Wirkstoffbeladung von Liposomen gemäß der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen bei einem definierten pH-Wert permeabilisiert und verschlossen werden.
- 5 14. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung von Nanokapseln.
- 10 15. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik.
- 15 16. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zum Transport und/oder zur Freisetzung von Wirkstoffen.
- 20 17. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 als Depotformulierung und/oder als zirkulierendes Depot.
- 25 18. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 bei intravenöser oder peritonealer Applikation.
19. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und ex vivo.

**Figur 1A**

Transfektion von HeLa-Zellen mit amphoteren Liposomen  
(POPC/DOTAP/CHEMS 60/30/10)



5

**Figur 1B**

Transfektion von CHO-Zellen mit amphoteren Liposomen  
10 (POPC/DOTAP/CHEMS 60/30/10)

